

Partial translation of Reference 3 (JP Patent Publication (Kokai) No. 3-4790 A (1991))

The claim: A method for stabilizing an enzyme characterized by adding a protein-like material and polysaccharide to an aqueous solution of proteolytic enzyme.

Page 2, upper left column line 17 to upper right column, line 14:

Examples of the proteolytic enzyme which may be used in the present invention include, without limitation, pepsine, chymotrypsin, trypsin, pancreatin and other proteolytic enzymes of animal origin, papain of plant origin, proteases of microbial origin produced by *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus* and the like.

The polysaccharide of the present invention includes naturally-occurring polysaccharides such as gum arabic, guar gum, xanthan gum, locust bean gum, starch, dextran, pullulan, alginate, hyaluronan, carrageenan, pectin, chitosan and salts and derivatives thereof, as well as cellulose derivatives such as carboxymethyl cellulose, methylcellulose, ethylcellulose, hydroxypropylcellulose and salts thereof. Polysaccharides soluble in water may be used and hyaluronan and alginate as well as salts thereof are preferable since these are easy to handle and their effects are high.

PA06-316

English abstract of reference 3

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-004790

(43)Date of publication of application : 10.01.1991

(51)Int.Cl.

C12N 9/96

(21)Application number : 01-137665

(71)Applicant : KANEBO LTD

(22)Date of filing : 30.05.1989

(72)Inventor : FUKUNAGA SHINICHI
FUJINO YASUMITSU
NAKAYAMA HIROSHI

(54) STABILIZATION OF ENZYME

(57)Abstract:

PURPOSE: To stabilize a protease in a high-temperature range by blending an aqueous solution of protease with a protein-like substance and a polysaccharide.

CONSTITUTION: An aqueous solution of a protease such as pepsin or chymotrypsin is blended with preferably 0.01-10wt.% protein-like substance (e.g. protein or tosylarginine methyl ester) and preferably 0.5-10wt.% polysaccharide (preferably hyaluronic acid, alginic acid or salt thereof) for stabilizing the enzyme.

⑫ 公開特許公報(A) 平3-4790

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)1月10日

C 12 N 9/96

7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 酵素の安定化法

⑰ 特 願 平1-137665

⑱ 出 願 平1(1989)5月30日

⑲ 発 明 者 福 永 真 一 大阪府大阪市城東区鳴野西5丁目12番6-207号

⑲ 発 明 者 藤 野 泰 光 大阪府大阪市都島区友浜町2丁目12番21-204号

⑲ 発 明 者 中 山 博 大阪府枚方市東山1丁目38番5号

⑲ 出 願 人 鐘 紡 株 式 会 社 東京都墨田区墨田5丁目17番4号

明 細 書

1. 発明の名称

酵素の安定化法

2. 特許請求の範囲

- (1) タンパク質分解酵素の水溶液にタンパク質様物質及び多糖類を添加することを特徴とする酵素の安定化法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、タンパク質分解酵素の安定化方法に関する。

(従来の技術)

酵素は、常温で、特異的、選択的な反応を行う触媒として、多くの分野で利用されている。タンパク質分解酵素も、医薬、洗剤、化粧品や絹の精練などに有効に利用されている。しかし、こうした生体触媒は熱やpH変化などに対する安定性が低く、その応用が制限される欠点がある。

特に、酵素を含有する形態が水を含む系であり、水溶液の場合、保存中にも速やかに活性が

低下する問題点があり、実際には、種々の安定化剤を添加したり、冷蔵保存する等の対策がとられている。

酵素の失活は、一般には熱運動による構造変化に基づく変性失活と考えられるが、タンパク質分解酵素の場合は、更に酵素相互の分解(自己消化)による失活も起こる。

このような事情を考慮し、タンパク質分解酵素の安定化を目的とした種々の方法が提案されている。例えば、タンパク質分解酵素の水溶液に、カゼイン、ゼラチンなどを添加する方法(特公昭41-152号公報)、可溶性高分子に酵素を共有結合させ、その水溶液に更にアルブミン、ゼラチンなどのタンパク質を添加する方法(特開昭57-122796号公報)、又酵素を配合した液体洗剤にカルシウムイオン、ギ酸ナトリウム、アルコールなどを添加する方法(特公昭58-11196号公報)、ジカルボン酸及び還元性無機塩類を添加する方法(特公昭59-217799号公報)などがある。

しかるに、このような方法は目的によっては、その配合が制限されたり、又、その効果についても或る程度は有効性が認められるが、未だ満足すべきものがないのが実情である。特に高温条件下での安定化効果は低く、流通、保存過程で高温にさらされると大幅に活性が損われる。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者らは、上述の問題点を解決すべく鋭意研究を行なった結果本発明を完成したものであって、その目的とするところは、安定性、特に高温安定性に著しく優れ、且つ適用範囲が広い酵素の安定化方法を提供するにある。

(課題を解決するための手段)

上述の目的はタンパク質分解酵素^の水性溶液中に多糖類及びタンパク質様物質を添加することと特徴とする酵素の安定化方法により達成される。

本発明に用いられるタンパク質分解酵素は特に限定されないが、動物起源のペプシン、キモトリプシン、トリプシン、パンクレアチン等、植物起源のパパイン、微生物起源のアスペルギス属、リ

しくは0.6～10重量%の範囲で用いられる。本発明でいうタンパク質様物質としては、タンパク質のほかペプチド類、アミノ酸エステル類等を用いることができる。例えば、トシルアルギニンメチルエステル、アセチルチロシンエチルエステル、フィブロイン、アルブミン、カゼイン、ゼラチン等が用いられるが、特に化粧品への配合を目的としたり、物質生産に用いる場合、添加物の分解に伴う臭気や不純物の混入が問題となるので、タンパク質分解酵素に資化されにくい物質などを適宜選択使用することが好ましい。

例えば、バチルス属菌の産生するセリン型エンドプロテアーゼを用いる場合、ゼラチンを添加剤として用いるとよい。

本発明に使用するタンパク質様物質の濃度はタンパク質の種類、酵素濃度等によって異なり一概に規定できないが、0.01%以上であることが好ましい。タンパク質様物質を過度に添加しても効果が飽和することや粘性などの物性、溶解度等を考慮すると、好ましくは0.01～10重量%、更に好ま

しくは0.01～10重量%の範囲で用いられる。

本発明の多糖類としては、アラビアガム、グアーガム、ゼンタンガム、ローカストビーンガム、デンプン、デキストラン、プルラン、アルギン酸、ヒアルロン酸、カラギーナン、ペクチン、キトサンなどの天然多糖類、及びそれらの塩や誘導体、又、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどのセルロース誘導体、及びそれらの塩などが挙げられ、水可溶のものであれば用いることができるが、その効果の大きさ、使い易さなどからヒアルロン酸、アルギン酸及びそれらの塩が特に好ましい。用いる多糖類の濃度は大きくなる程、その効果も大きくなる傾向があり、又その効果も多糖類の種類、分子量により異なるが、0.05重量%以上であることが好ましい。上限は特に限定されないが、過度に添加しても効果が飽和することや粘性などの物性、溶解度等を考慮すると、好ましくは0.05～20重量%、更に好ま

しくは0.01～10重量%の範囲で用いられる。

(発明の効果)

本発明方法により、水性溶液中の酵素は著しく安定化されるが、その程度は多糖類及びタンパク質様物質の種類、濃度の他、酵素の種類、濃度にも依存し、目的に応じてこれらの条件を適宜選択することが望ましい。更に、本発明の方法では、50℃以上の高温領域で、その安定化能が顕著に高いことが特長的であり、条件によっては60℃で24時間保存しても、殆んどその活性は失われない。

本発明の方法は、化学修飾した酵素や、不溶性担体に結合した酵素に適用することでもできる。更に他の安定化剤と共に添加して用いることもできる。

本発明の方法は、上述した如く、水系媒体中の酵素の安定性、特に高温安定性を大きく向上させ、その適用範囲が広く、又、安全な方法であることから、化粧品、薬品、洗剤などの化成品に好適に

応用できるばかりでなく、それらの商品が流通、保存の間に高温にさらされる事に起因するトラブルを避けることができる。

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。実施例中、プロテアーゼ活性の測定並びに試薬及び試液の調製は以下に記載する方法により行った。

〔活性測定〕

プロテアーゼ活性は、アンソン氏改良法に基づき、以下の方法で測定した。

カゼイン溶液 5 ml を試験管 (18×180 mm) に入れ、30±0.5℃で10分間放置した後、試料溶液 1 ml を正確に量って加え、直ちに振り混ぜた。この液を30±0.5℃で正確に10分間放置し、トリクロル酢酸試液 5 ml を加えて振り混ぜ、再び30±0.5℃で30分間放置した後、濾紙 (No 131、φ9 cm) で濾過した。濾液 2 ml を正確に量り、0.65 M 炭酸ナトリウム試液 5 ml 及び、フォリン試液 1.0 ml を加え、40℃で30分間放置した後、糖原基一般試験法、吸光度測定法により 660 nm における吸光度 A_t を測

定した。

空試験として別に試験溶液 1 ml を正確に量り、トリクロル酢酸 5.0 ml を加えて振り混ぜた。更にカゼイン溶液 5 ml を加えて振り混ぜ、30±0.5℃で30分間放置し、以下同様に操作して、吸光度 A_b を測定した。

プロテアーゼ力価は、次式により求めた。なお、この条件下で1分間に1μgのチロジン量に相当する非蛋白性のフォリン試液呈色物質の増加をもたらす酵素量を1プロテアーゼ活性単位とした。

$$\text{プロテアーゼ力価(単位/g)} = (A_t - A_b) \times 65.5 \times N$$

N: 試料の希釈倍数 (1 g 当り)

〔試薬及び試液〕

1) カゼイン溶液

乳性カゼイン約1gを正確に量り、105℃で2時間乾燥し、その減量を測定した。その乾燥物 1.20 g に対応する乳性カゼインを正確に量り、0.05 M 磷酸一水素ナトリウム試液 160 ml を加え、水浴中で加温して溶かし、流水で冷却した後1 N 水酸化ナトリウム試液で pH 8.0

に調製した後、水を加えて200 ml とした。

2) トリクロル酢酸試液

トリクロル酢酸 1.8 g および無水酢酸ナトリウム 1.8 g に6 N 酢酸 6.6 ml および水を加えて100 ml とした。

3) 0.65 M 炭酸ナトリウム試液

無水炭酸ナトリウム 8.8 g に水を加えて溶かし、1000 ml とした。

4) フォリン試液

フェノール試薬 (和光純薬製) を2倍希釈して用いた。

実施例 1

パセリウス・リケニホルミスの産生するタンパク質分解酵素エスペラーゼ (ノボ社製) を精製して調製した酵素の溶液 (0.1 M リン酸緩衝液 pH 7) にゼラチン、ヒアルロン酸を添加し、50℃における安定性を測定した。結果を第1表に示す。

第 1 表

試験 №	酵 素 (単位/ml)	ゼラチン 0.25%	ヒアルロン酸 1.0%	活性残存率(%)
1	40	×	×	48
2	40	○	×	85
3	40	×	○	92
4	40	○	○	100
5	200	×	×	33
6	200	○	×	63
7	200	×	○	63
8	200	○	○	72
9	400	×	×	25
10	400	○	×	39
11	400	×	○	47
12	400	○	○	69

但し、活性残存率は pH 7, 50℃ 30時間保存後の値を示す。

第 2 表

実験 No	ゼラチン(%)	アルギン酸(%)	活性残存率(%)
1	無添加	無添加	4.2
2	1.25%	無添加	8.0
3	無添加	1.25%	7.5
4	0.25%	0	6.3
5	0.25	0.03	8.5
6	0.25	0.05	7.1
7	0.25	0.25	7.3
8	0.25	0.5	7.7
9	0.25	1.0	8.1
10	0.25	1.5	8.5
11	0	0.5	6.5
12	0.005	0.5	6.8
13	0.01	0.5	7.3
14	0.25	0.5	7.7
15	0.5	0.5	8.2
16	1.0	0.5	8.5
17	1.25	0.5	9.8

但し、活性残存率は50℃で40時間保存した後の値である。

(以下余白)

実施例 2

実施例 1 と同様にして得た酵素の溶液(40単位/㎖, 0.1Mリン酸緩衝液, pH7)について50℃安定性に対するゼラチン, アルギン酸の濃度効果を検討した。結果を第2表に示す。

実施例 3

実施例 1 と同様にして得た酵素の溶液(40単位/㎖, 0.1Mリン酸緩衝液 pH7)について、37℃安定性におけるゼラチン, ヒアルロン酸の添加効果を検討した結果を第3表に示す。

第 3 表

牛血清アルブミン(%)	ヒアルロン酸(%)	残存活性(%)
0	0	4.8
2.0	0	8.1
0	2.0	7.3
1.0	1.0	10.0

但し、37℃ 50日後の残存活性を示す。

実施例 4

実施例 1 と同様にして得た酵素の溶液(40単位/㎖, 0.1Mリン酸緩衝液, pH7)の50℃安定性に対するゼラチン及び各種添加物の添加効果を検討した。結果を第4表に示す。

%とした。

第 4 表

添 加 物	残存活性(%)
グルコース	7.1
シロ糖	7.3
デキストラン	7.6
ヒドロキシプロピルセルロース	8.7
カルボキシメチルセルロース	8.7
ヒアルロン酸	10.0
アルギン酸ナトリウム	9.6
ポリエチレングリコール-3000	7.1
プロピレングリコール	7.4
ゼラチンのみ	7.2
無 添 加	4.3

但し、50℃, 40時間後の残存活性を示す。

実施例 5

パセルス属菌の産生する酵素バイオプラーゼ(ナガセ生化学社製)を精製して得た酵素の溶液(40単位/㎖, 0.1Mリン酸緩衝液 pH7)の

60℃安定性に対するゼラチン、ヒアルロン酸の効果を検討した結果を第5表に示す。

第5表

ゼラチン (%)	ヒアルロン酸 (%)	活性残存率 (%)
0	0	5
2	0	7.5
0	2	6.3
1	1	8.8

但し、60℃ 15時間後の残存活性を示す。

以上の結果から明らかな如く、タンパク質分解酵素水溶液に多糖類と、タンパク質様物質とを併用添加することにより、それぞれを単独で用いた場合に比較して、酵素を相乗的に安定化することが明らかである。

又、この安定化効果は、多糖類がヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、アルギン酸などである場合に大きく、特にヒアルロン酸やアルギン酸では著しい安

定化が認められた。

こうした安定化効果は、特に高温領域で顕著であり、本発明の方法は酵素水溶液から成る製品の製造、保存、流通に有用性の高い方法であることがわかる。

実施例6

実施例5と同様の系について37℃における安定性を検討した。結果を第6表に示す。

第6表

ゼラチン (%)	ヒアルロン酸 (%)	活性残存率 (%)
0	0	3.7
2	0	7.5
0	2	6.3
1	1	8.8

但し、37℃ 30日後の残存活性を示す。

出願人 鐘紡株式会社

